

جداسازی و شناسایی سویه بومی قارچی *Aspergillus niger* ZRS14 با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون روی و کاربرد سوپرناتانت آن در سنتز خارج سلولی نانوذره اکسید روی

مراحم آشنگرف: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه کردستان، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir*

چکیده

مقدمه: نانوذره اکسید روی کاربرد وسیعی در زیست واکشنرها، اپتیک، مکانیک، مغناطیس و انرژی، پزشکی و بهداشتی دارد. در ساخت نانوذرات روی به روش‌های فیزیکی- شیمیایی، مشکلاتی از قبیل آلودگی محیط زیست، هزینه بر و پیچیده بودن فرآیند سنتز وجود دارد. بنابراین، نیاز به توسعه روش‌های زیستی تولید نانوذرات از نظر دستیابی به ذراتی متحدالشکل، مصرف انرژی پایین، خلوص بالا، آلودگی زیست محیطی کمتر و سهولت کار وجود دارد. این تحقیق بر غربال‌گری و جداسازی سویه‌های بومی قارچی با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون سمی روی و امکان استفاده از ترشحات قارچی به‌عنوان کاتالیزورهای زیستی برای سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی متمرکز شده است.

مواد و روش‌ها: در یک سری آزمایش‌های غربال‌گری تعداد ۱۵ سویه قارچی براساس مشاهدات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و آزمایش‌های ریخت‌شناسی تشخیصی، از خاک‌های معادن روی و سرب انگوران زنجان، براساس تکنیک غنی‌سازی انتخابی، جداسازی شدند. تحمل‌پذیری ذاتی سویه‌های جدا شده نسبت به یون سمی روی در محیط‌های کمپلکس و سنتتیک به روش رقت در آگار تعیین شد. سوپرناتانت‌های حاصل از قارچ‌های جداسازی شده با محلول استات روی در شیکر انکوباتوردار به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند و گونه قارچی که قادر به سنتز نانوذرات اکسید روی بود، شناسایی شد. نانوذره اکسید روی تشکیل شده در محلول واکنش زیست‌تبدیلی با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری، طیف‌سنجی و میکروسکوپی بررسی شد.

نتایج: از میان ۱۵ سویه قارچی غربال‌گری شده، سویه ZRS14 که دارای بالاترین تحمل‌پذیری نسبت به یون سمی روی بود، به‌عنوان سویه منتخب از نظر صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و همچنین، فیلوژنی و مولکول تحت عنوان *Aspergillus niger* strain ZRS14 شناسایی و در بانک جهانی اطلاعات ژنی NCBI، با شماره قابل دسترسی KF414527، ثبت شد. در ادامه این تحقیق، سوپرناتانت حاصل از قارچ *A. niger* ZRS14 جداسازی شده، با محلول استات روی (با غلظت نهایی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر یون روی) در شیکر انکوباتوردار با دور ۱۵۰ rpm و به دور از نور، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. سپس، بررسی تولید نانوذرات به صورت ماکروسکوپی با تغییر رنگ محلول واکنش، بررسی طیف‌سنجی UV-vis مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی نانوذرات، تحلیل طیف پراکندگی عنصری اشعه ایکس (XRD) و میکروگراف‌های بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM، انجام شد. یافته‌های بدست آمده نشان داد که سوپرناتانت جمع‌آوری شده از قارچ *A. niger* ZRS14، قادر به سنتز نانوذرات اکسید روی با توزیع کمابیش باریک اندازه ذرات و متوسط اندازه ذرات ۳۲ نانومتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به سنتز خارج سلولی نانوذره اکسید روی، می‌توان امیدوار بود از سویه بومی *A. niger* ZRS14 غربال‌گری شده در پژوهش‌های اخیر، به‌عنوان یک بیوکاتالیزور کارآمد و سازگار با محیط زیست برای تهیه زیستی نانوذرات فلزی اکسید روی در مقیاس‌های بزرگتر از مقیاس آزمایشگاهی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: الگوی تحمل‌پذیری، سنتز زیستی، نانوذرات اکسید روی، *Aspergillus niger* ZRS14

مقدمه

فناوری نانو در سه سطح تولید مواد، وسایل، دستگاه‌ها و سیستم‌ها بکار گرفته می‌شود. آنچه باعث ظهور علم نانو فناوری شده، نسبت بالای سطح به حجم است که باعث شده مواد در مقیاس نانو شروع به تغییر رفتار کرده و رفتار سطح بر رفتار توده ای غلبه کند (۱) و (۲). در واقع در این مقیاس قوانین فیزیک کلاسیک از بین رفته و قوانین فیزیک کوانتومی وارد صحنه می‌شود. تقریباً وقتی به مقیاس نانو می‌رسیم خواص فیزیکی-شیمیایی و حتی رنگ، نقطه ذوب و خواص شیمیایی کاملاً متحول می‌شود. افزایش نسبت سطح به حجم باعث می‌شود که اتم‌های واقع در سطح نسبت به اتم‌های درون حجم ذرات، اثر بیشتری روی خواص فیزیکی ذرات داشته باشند (۳). این ویژگی واکنش پذیری ذرات را به شدت افزایش داده به گونه ای که این ذرات به شدت تمایل به آگلومراسیون دارند. مثلاً نانوذرات فلزی به محض قرارگیری در برابر هوا به شدت اکسیده می‌شوند. از این خاصیت به عنوان واکنشگرهای شیمیایی بسیار قوی می‌توان استفاده کرد و یا در تولید کامپوزیت‌ها با استفاده از این ذرات، می‌توان پیوندهای شیمیایی مستحکم تری بین ماده زمینه و ذرات برقرار نمود که در این صورت استحکام کامپوزیت به شدت افزایش می‌یابد (۴). افزایش نسبت سطح به حجم علاوه بر افزایش واکنش پذیری ذرات، فشار سطحی را تغییر داده و باعث می‌شود که فاصله بین اتم‌های ذرات با کاهش اندازه ذره کاهش یابد. البته این امر برای نانوذرات فلزی صادق است و در مورد نیمه‌هادی‌ها و اکسیدهای فلزی با کاهش اندازه ذره فاصله بین اتم‌ها افزایش می‌یابد. تغییر در فاصله بین اتم‌های ذرات و نسبت بالای سطح به حجم تأثیرات متقابلی بر روی

خواص نوری، مغناطیسی، الکترونیکی و ترمودینامیکی ماده خواهد داشت. نانوذرات که شامل: نانوذرات فلزی، نیمه‌هادی‌ها و اکسیدهای فلزی هستند، به عنوان زیست واکنشگرهای^۱ قدرتمند عمل نموده که راندمان واکنش‌های شیمیایی را به شدت افزایش داده و همچنین، به میزان چشمگیری از تولید مواد زائد در واکنش‌ها جلوگیری می‌کنند (۲ و ۴). بکارگیری نانوذرات در تولید مواد دیگر استحکام آن‌ها را افزایش داده، وزن آن‌ها را سبک کرده، مقاومت شیمیایی و حرارتی آن‌ها را بالا برده و واکنش آن‌ها را در برابر نور و تشعشعات دیگر تغییر می‌دهد. بنابراین، در تولید نانو کامپوزیت‌ها استفاده می‌شوند (۵ و ۶). در سال‌های اخیر کوشش‌های بسیار زیادی برای تولید نانوذرات به علت خواص ویژه نوری، شیمیایی، الکترونیکی و فوتوالکترونیکی آن‌ها انجام شده است که مویده استفاده‌های گوناگون این مواد در زمینه‌هایی چون کاتالیست‌ها، اپتیک، دانش داروهای زیستی، مکانیک، مغناطیس و انرژی است (۷). روش‌های معمول فیزیکی-شیمیایی تولید نانوذرات اکسید روی شامل: رسوب فیزیکی بخار، چگالش گازخشی، فرآیند سل-ژل (رسوب دهی محلول شیمیایی)، احیای الکتروشیمیایی، تجزیه نوری و حرارتی، میکرو امولسیون و احیای شیمیایی است (۸، ۹ و ۱۰). بیشتر تکنیک‌های بالا با وجود سرعت بالا دارای معایبی از جمله هزینه بالا، مصرف مواد و انرژی بالا، آلودگی زیست محیطی و ایجاد ذرات بی کیفیت (توزیع نامناسب ذرات و پایداری پایین) هستند. بنابراین، تقاضا برای پیشبرد روش‌های سنتزی کم هزینه، مطمئن و محافظ محیط زیست وجود دارد و این امر نقش روش‌های زیستی تولید نانوذرات را پررنگ تر می‌کند (۴ و ۱۱).

اکسید اورانیوم) انجام شده که به شناسایی میکروارگانیسم‌های مختلف شامل: باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرهایی از قبیل *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Lactobacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Rhodococcus* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Shewanella* sp., *Candida* sp., *Torulopsis* sp. و *Fusarium* sp., *Streptomyces* sp. *Aspergillus* sp. منتهی شده است (۴ و ۶). طلا و نقره از مهم‌ترین فلزاتی هستند که بیش‌ترین تحقیقات را در این زمینه به خود اختصاص داده‌اند. با این حال، در ارتباط با تولید زیستی نانوذرات فلزی روی مطالعات بسیار کمی در سطح جهانی انجام شده است که در این ارتباط می‌توان به مطالعات پراساد^۵ و ژا^۶ و جاین^۷ و همکارانش در رابطه با تولید نانوذرات اکسید روی به ترتیب در سویه‌هایی از *Lactobacillus sporogenes* و *Aspergillus aeneus* اشاره نمود (۱۱ و ۱۸). هدف از تحقیق حاضر، تولید نانوذرات اکسید روی با هدف معرفی یک سویه بومی کارآمد برای تولید نانوذرات اکسید فلزی روی بوده است. در این راستا، سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی در سویه بومی غربال‌گری شده *A. niger* isolate ZRS14 گزارش شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت استفاده شده

نمک استات روی دو آب^۸ با خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگما-آلدریچ^۹ خریداری شد. محلول‌های استوک روی در آب مقطر حل شده و بعد از فیلتراسیون به وسیله فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. محیط‌های کشت جامد و مایع سیب زمینی دکستروز آگار^{۱۰} و برات^{۱۱} حاوی ۴ گرم در لیتر عصاره خیس‌انده سیب زمینی، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱۵ گرم در لیتر

سیستم‌های زیستی از قبیل گیاهان، جلبک‌ها، کپک‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌ها قادر به تولید نانوذرات فلزی هستند که در این میان قارچ‌های رشته‌ای به علت وجود مقادیر در خور توجهی از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ترشحی ویژه در این میکروارگانیسم‌ها، سهولت کار با آن‌ها در آزمایشگاه، سهولت دسترسی به مقادیر زیادی توده زیستی^۲ و شاید از همه مهمتر فرآیند پردازش پایین دستی^۳ ساده از جذابیت بالاتری برخوردار هستند (۱۲ و ۱۳). مزایای تولید زیستی نانوذرات بر تولید شیمیایی عبارتند از: تمیز بودن بسیار بالا، سازگاری بالا با محیط زیست، توزیع مناسب ذرات^۴، پایداری بالا، انعطاف‌پذیری بیشتر، انتشار نور بهتر و آسانی تولید است (۱۴). نانوذره روی از عناصر پایه علم نانو است که به علت کاربردهای فراوان آن در صنایع مختلف مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به ویژگی‌های نوری و الکتریکی منحصر بفرد نانوذره اکسید روی، از این نانوذره در پوشش‌های رسانای اکسیدی با قابلیت عبور دهی بالا برای سلول‌های خورشیدی، حسگرهای گازی، آشکار سازهای نوری فرابنفش، جاذب شیمیایی، کاتالیست‌هایی برای هیدروژن دار کردن در فاز مایع و کاتالیست‌هایی برای تخریب نوری به جای نانو ذره‌های تیتانیوم نام برد (۱۵ و ۱۶). از نانوذرات اکسید روی همچنین به عنوان واکنشگرهای شیمیایی بسیار قوی برای افزایش بازده واکنش‌های شیمیایی، تولید نانو کامپوزیت‌ها و ساخت شیشه‌های ضد آفتاب استفاده می‌شود (۱۷). در دو دهه گذشته مطالعات زیادی برای تولید میکروبی نانوذرات فلزی (طلا، نقره، روی، منگنز، مس، کروم و پلاتینیوم)، نیمه‌هادی‌ها (سولفید روی، سولفید کادمیوم، سولفید سرب و سولفید آهن) و اکسیدهای فلزی (زیرکونیوم، اکسید منگنز، مگنتیت و

خالص و حاصل از یک اسپور به دست آیند. شناسایی اولیه سویه‌های قارچی جدا شده براساس ویژگی‌های رشد بر روی محیط‌های کشت جامد، ظاهر میکروسکوپی آن‌ها و همچنین خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها انجام شد (۱۹).

پروفایل تحمل پذیری سویه‌های قارچی غربال‌گری شده نسبت به یون سمی روی

تحمل پذیری سویه‌های قارچی غربال‌گری شده با روش رقت در آگار تعیین شد (۲۰). برای این منظور به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت کمپلکس PDA و سنتتیک M9 با اندکی تغییرات (۲۱) (گلوکز ۵ گرم در لیتر، کلرید آمونیوم ۲/۵ گرم در لیتر، سولفات منیزیم هفت آبه ۰/۵ گرم در لیتر، سدیم کلراید ۰/۵ گرم در لیتر، کلسیم ۰/۱۵ گرم در لیتر، سولفات آهن هفت آبه ۰/۰۳ گرم در لیتر و بافر نمکی فسفات ۱۰۰ میلی‌مولاری با اسیدیته برابر ۵/۶)، غلظت‌های خاصی از یون روی (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بصورت جداگانه اضافه شده و داخل پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شد. سپس به‌وسیله سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی از محیط مایع PDB که قارچ مورد نظر در آن رشد کرده (رشد لگاریتمی) و تراکم آن $10^6 \times 1/5$ cfu/ml، با دانسیته سلولی^{۱۶} برابر ۰/۱۲ بود، به‌عنوان مایه تلقیح^{۱۷} استاندارد بصورت کشت نقطه‌ای بر روی محیط‌های کشت محتوی آگار کمپلکس و سنتتیک، قرار گرفت. پلیت‌ها پس از ۷ روز گرما‌گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، مطالعه شدند. از محیط‌های کشت تلقیح شده فاقد یون روی، به‌عنوان کنترل استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار متوالی تکرار شدند.

آگار با اسیدیته برابر ۵/۶، از شرکت مرک^{۱۲} خریداری شد. آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل از کمپانی هایمدیا^{۱۳} تهیه شد. محلول استوک کلرامفنیکل (۳۴mg/l) در اتانول تهیه و سپس توسط فیلترهای غشایی میلی‌پور استریل شده و تا زمان استفاده در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بیشتر مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز از شرکت سیناژن^{۱۴} تهیه شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده با درجه خلوص بالا بودند. در تمامی مراحل آزمایش‌های مربوط به سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد.

روش نمونه‌گیری و غربال‌گری سویه‌های قارچی تحمل‌پذیر به فلز سمی روی

برای جداسازی سویه‌های قارچی با پتانسیل تحمل‌پذیری به یون روی، نمونه‌های خاک از معادن روی و سرب انگوران، واقع در استان زنجان، جمع‌آوری شد. نمونه برداری در ظروف استریل انجام شد. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده سری رقت از 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد. از هر رقت ۳۰۰ میکرولیتر در محیط‌های کشت PDA آگار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر یون روی به روش کشت چمنی^{۱۵} با میله‌ی سرکج کشت داده و پلیت‌های مذکور به مدت ۵ روز تحت شرایط تاریکی در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرما‌گذاری شدند. برای جلوگیری از آلودگی‌های باکتریایی به محیط‌های کشت اتوکلاو شده، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در غلظت نهایی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد. پس از حدود ۵ روز کلونی‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها خالص‌سازی شدند. سپس تک اسپور کردن کلونی‌های خالص‌سازی شده انجام شد تا قارچ‌هایی

شناسایی سویه قارچی ZNRS14 با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی

شناسایی اولیه سویه قارچی ZRS14 براساس مشاهدات ماکروسکوپی، مشاهدات میکروسکوپی و بررسی شاخص‌های ریخت‌شناسی مختلف از جمله رنگ، ساختار میسیلیوم، الگوی تشیکل اسپور، نحوه استقرار هیف‌ها و مشاهده انشعابات هیف‌ها انجام شد (۱۹). سپس، برای تایید دقیق جنس و گونه سویه مذکور از تعیین ترادف ژن rDNA استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه ZRS14 به روش تخریب با کمک ازت مایع و با استفاده از کیت استخراج DNA (کمپانی هایمدیا) انجام شد. به منظور استخراج DNA از سویه قارچی ZRS14، قارچ مورد نظر در محیط کشت PDB کشت داده شد. پس از جداسازی میسیلیوم از محیط کشت با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (۳۰۰۰×g، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) و شستشوی آن با آب مقطر استریل، توده میسیلیومی جمع‌آوری شده به کمک ازت مایع خرد و سپس استخراج DNA به کمک کیت استخراج DNA مخصوص قارچ‌ها، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. پس از تعیین کیفیت و کمیّت DNA استخراجی به کمک روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز، DNA استخراج شده مورد آزمون PCR اختصاصی با استفاده از دو پرایمر همه‌گانی ITS3 (پرایمر رفت) [5' - gcatcgatgaagaacgcagc-3' ITS4 و (پرایمر برگشتی) [5' - tcctccgctttattgatatgc-3'] که برای نواحی حفاظت شده ژن‌های ریبوزومی 18S و 28S طراحی شده‌اند، و بخش کاملی از زیر واحد ریبوزومی 5.8S و همچنین، نواحی غیرکدینگ ITS2 را تکثیر می‌دهند، قرار گرفت (۲۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش متشکل از

۳۰۰ نانوگرم DNA الگو (با غلظت ۱ میکروگرم بر میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر بافر 10X P^oR با غلظت برابر 1X، ۲ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت برابر ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۲۵ میکرومولار، ۴ میکرولیتر از نوکلئوتیدهای چهارگانه (با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (با غلظت ۵ U (و مابقی آب مخصوص PCR تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد. برنامه تکثیر با واسرشت اولیه^{۱۸} در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل بصورت واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمر^{۱۹} به DNA ژنومی در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. بسط نهایی^{۲۰} در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از انجام شدن PCR، محصول بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در شرایط بافری TAE تحت تاثیر ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. محصول حاصل از PCR (تقریباً ۳۵۰ جفت باز) با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR شرکت فرمنتاز^{۲۱}، تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت فزایپژوه برای ارسال به کمپانی ماکروژن^{۲۲} کره جنوبی ارسال شد. برای شناسایی توالی‌ها از برنامه‌های BioEdit و Finch TV و برای بررسی و تحلیل توالی‌ها از الگوریتم بلاست کردن در بانک جهانی اطلاعات ژنی^{۲۳} استفاده شد. پس از مطابقت توالی‌های نوکلئوتیدی شناسایی شده با ترادف‌های موجود در بانک ژنی، با استفاده از نرم افزار مگا^{۲۴} درخت فیلوژنیکی سویه قارچی غربال‌گری شده رسم شد (۲۳).

سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی توسط سویه قارچی ZRS14

۱۰ میلی گرم از اسپورهای غیرجنسی سویه قارچی ZRS14، برداشت شده از یک کشت ۱۴ روزه بر روی محیط PDA، به یک محلول نمکی استریل حاوی ۰/۱ درصد توین ۸۰ و ۰/۸۵ درصد نمک سدیم کلراید منتقل شده و به مدت ۲ ساعت بر روی یک شیکر دورانی با سرعت ۲۰۰ rpm هم‌زده شد. پس از شمارش در زیر میکروسکوپ حدود یک میلی لیتر از غلظت اسپور مورد نظر (1×10^6 spores/ml) به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع PDB درون فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری و تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر دورانی با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن میسیلیوم قارچی از محیط کشت مایع PDB، از سانتریفیوژ یخچالی با دور ۵۰۰۰ rpm در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از سه بار شستشو با آب دو بار تقطیر استریل، ۲۰ گرم از توده زیستی مذکور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر استریل بود، ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، توده قارچی با استفاده از فیلتراسیون به کمک کاغذ صافی واتمن جدا شد. پس از جمع‌آوری، از سوپرناتانت عاری از میسیلیوم قارچ ZRS14 به‌عنوان بیوکاتالیزور، برای سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی استفاده شد. برای این منظور به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشت شده قارچی، محلول استات روی (با غلظت نهایی ۲۵۰ میلی گرم در لیتر یون روی) اضافه و به مدت ۷۲ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه

سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. بطور همزمان از محلول استات روی (بدون تلقیح سوپرناتانت قارچ ZRS14) به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد.

مشخصه یابی نانوذرات اکسید روی تشکیل شده

تشخیص نانوذرات اکسید روی تشکیل شده در محلول واکنش زیست‌تبدیلی، ابتدا با استفاده از مشاهدات چشمی از طریق تغییر رنگ محلول واکنش انجام شد. سپس برای تایید مشاهدات چشمی از تکنیک‌های UV-vis^{۲۵}، تحلیل طیف پراکندگی عنصری اشعه ایکس^{۲۶} و همچنین تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM^{۲۷} استفاده شد. در مرحله اول، شکل‌گیری نانو ذرات اکسید روی با مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش حاوی سوپرناتانت سویه قارچی ZRS14 و محلول استات روی مشخص شد. به منظور تعیین طیف جذبی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت $3000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، تحلیل‌های پراش پرتو ایکس با استفاده از XRD و مشاهدات میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM با هدف بررسی وضعیت نانو کریستال‌های تشکیل شده و همچنین بررسی ریخت‌شناسی آن‌ها انجام شد. برای این منظور، ابتدا سوپرناتانت عاری از کشت قارچی از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانو ذرات اکسید روی، نمونه‌ها با سرعت $15000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از شستشوی رسوب حاصل با آب مقطر دو بار تقطیر استریل، نمونه‌ها در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و تحلیل شدند.

نتایج

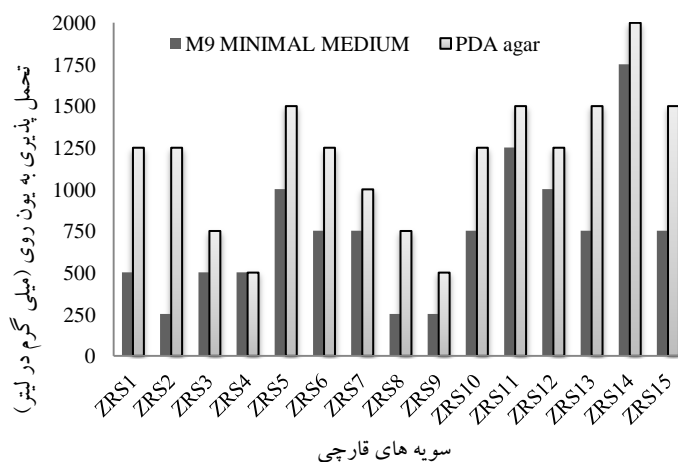
جداسازی و غربالگری سویه‌های قارچی با پتانسیل تحمل پذیری بالا به یون روی

با توجه به سمیت یون روی بر روی سلول‌های میکروبی، شناسایی و تشخیص سویه‌های میکروبی با پتانسیل تحمل پذیری بالا به یون سمی روی، می‌تواند به عنوان گام نخست ما را به گزینش سویه برتر هدایت کند. در این راستا، ۱۵ سویه قارچی (نام‌گذاری شده تحت عنوان ZRS1-ZRS15) براساس مشاهدات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و آزمایش‌های ریخت‌شناسی تشخیصی اولیه، از خاک‌های معادن روی و سرب انگوران زنجان، براساس تکنیک غنی‌سازی انتخابی، جدا سازی شدند. پروفایل تحمل پذیری ذاتی سویه‌های قارچی جدا شده نسبت به یون سمی روی، در محیط‌های کمپلکس و سنتتیک با روش رقت در آگار تعیین شد (شکل ۱). همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان تحمل پذیری سویه‌های بومی قارچی جدا شده در محیط‌های سنتتیک و کمپلکس به ترتیب بین ۲۵۰ تا ۱۷۵۰ میلی گرم در لیتر و ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین شد. در بین سویه‌های مذکور، سویه قارچی ZRS14 که بیشترین میزان تحمل پذیری را

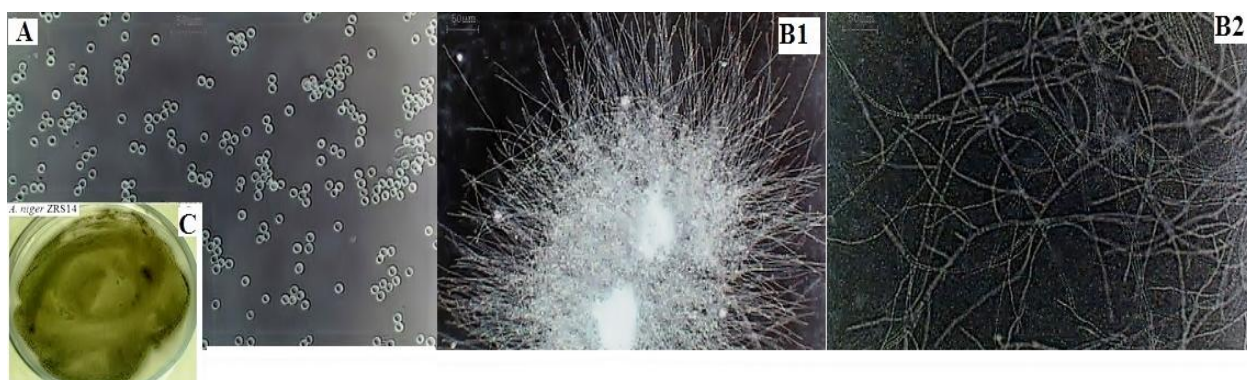
نسبت به یون سمی روی هم در محیط‌های کمپلکس (بالا تر از ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) و هم در محیط‌های سنتتیک (بالا تر از ۱۷۵۰ میلی گرم در لیتر) را نشان داد، به عنوان سویه برتر مورد مطالعات فنوتیپی و مولکولی برای تعیین هویت از نظر جنس و گونه قرار گرفت.

شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی سویه قارچی ZRS14

سویه ZRS14 که براساس تحلیل پروفایل تحمل پذیری دارای بیشترین تحمل پذیری به یون سمی روی بود انتخاب و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تشخیصی متداول قارچ‌ها شناسایی شد (۱۹) و به‌طور موقت به عنوان *Aspergillus niger* تشخیص داده شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و کشتی این سویه در شکل ۲ نشان داده شده است. سویه ZRS14، از نظر ماکروسکوپی، دارای کلونی کرکی و سیاه‌رنگ، اسپوره‌های غیر جنسی گرد و همچنین از نظر شکل ظاهری دارای میسلیم با تیغه میانی و کونیدیوفور است که بر روی آن وزیکول تقریباً گرد قرار گرفته است. شکل‌های میسلیمی بسته به شرایط فیزیکی-شیمیایی موجود در کشت می‌تواند به اشکال رشته‌ای و گلوله‌ای با انشعابات هیفی مشاهده شود (شکل ۲).

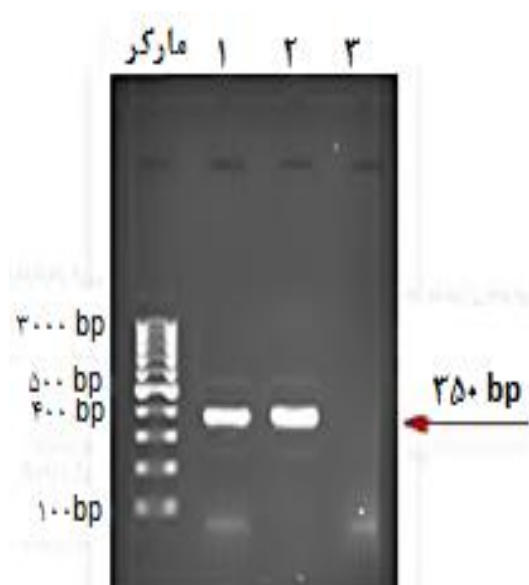


شکل ۱- پروفایل تحمل پذیری به یون روی در سویه‌های قارچی جدا شده از خاک‌های معادن روی و سرب



شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناسی سویه قارچی *A. niger* ZRS14

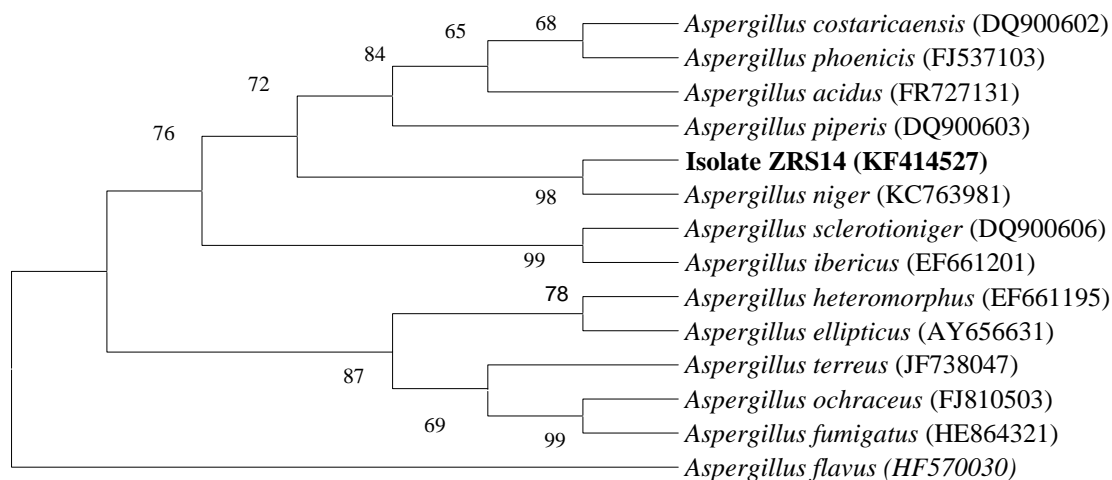
A: شکل میکروسکوپی اسپور غیر جنسی سویه ZRS14 B1 و B2: اشکال میکروسکوپی میسلیوم‌های سویه ZRS14 به ترتیب بعد از ۴۸ ساعت رشد در محیط PDB حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر یون روی و PDB بدون یون روی و C: رشد سویه ZRS14 در محیط کشت جامد PDA.



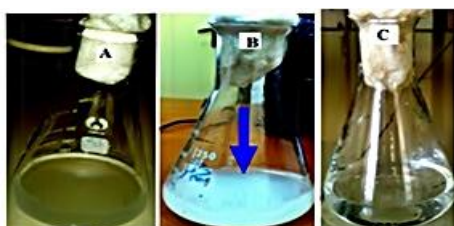
شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژنوم سویه قارچی ZRS14 ستون ۱: سویه ZRS14، ستون ۲: شاهد مثبت (*Aspergillus niger*)، ستون ۳: شاهد منفی (PTCC1243).

دسترسی KC763981 در سایت اینترنتی NCBI است. در ادامه با ترسیم درختچه فیلوژنی بر پایه روش neighbor-joinig با استفاده از نرم افزار MEGA-4 مشخص شد که این سویه در میان گونه‌های ثبت شده نزدیک‌ترین شباهت ژنتیکی را با گونه *Aspergillus niger* دارد. درختچه فیلوژنی سویه قارچی ZRS14 در شکل ۴ نشان داده شده است.

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، محصول PCR در ناحیه ۳۵۰ جفت بازی نمایان شده است که حکایت از خلوص DNA مورد استفاده برای تعیین توالی دارد. پس از مشخص شدن توالی ژن سویه مذکور و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI، قارچ مورد نظر تعیین هویت شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت ۹۸/۶ درصدی با گونه ثبت شده *Aspergillus niger* (با شماره



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک سویه قارچی ZRS14 رسم شده به روش Neighbour-joining که با گونه های مربوط در جنس *Aspergillus* نزدیکی نشان داد. درخت فیلوژنتیک با الگوریتم دو پارامتری کیمورا ترسیم شد. بررسی اعتبار شاخه های درخت با استفاده الگوریتم Bootstrap analysis و با ۱۰۰ بار نمونه گیری انجام شد. اعداد داخل پرانتز به شماره ژنی قابل دستیابی در بانک اطلاعات ژنی NCBI مربوط است. *Aspergillus flavus* به عنوان outgroup قرار داده شد.



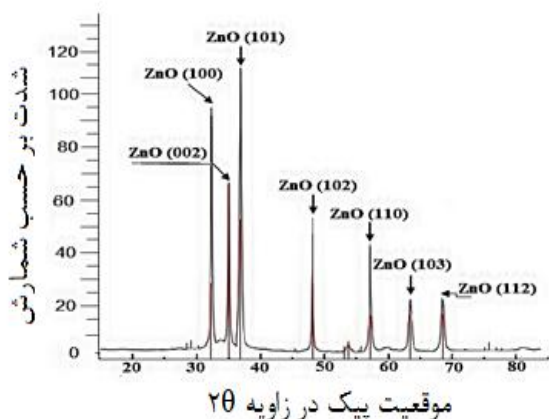
شکل ۵- محلول های استات روی (غلظت یون روی ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) بدنال اضافه کردن سوپرناتانت عاری از توده میسیلیومی قارچی *Aspergillus niger* isolate ZRS14 در ابتدای واکنش (A)، پس از ۷۲ ساعت واکنش زیست تبدیلی (B) و در محلول کنترل [(C) عاری از سوپرناتانت قارچی] بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)

در ادامه تحلیل نمونه ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی^{۲۸} نانوذرات، یک پیک جذب مشخص را در طول موج ۳۸۰ نانومتر (پیک اختصاصی برای نانوذرات اکسید روی) را نشان داد که براساس منابع معتبر بیانگر وجود نانوذرات روی در محلول واکنش زیست تبدیلی است (۱۸، ۲۴ و ۲۵). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت قارچی)، در طول

کاربرد سوپرناتانت *Aspergillus niger* isolate ZRS14 در تولید خارج سلولی نانوذرات اکسید روی

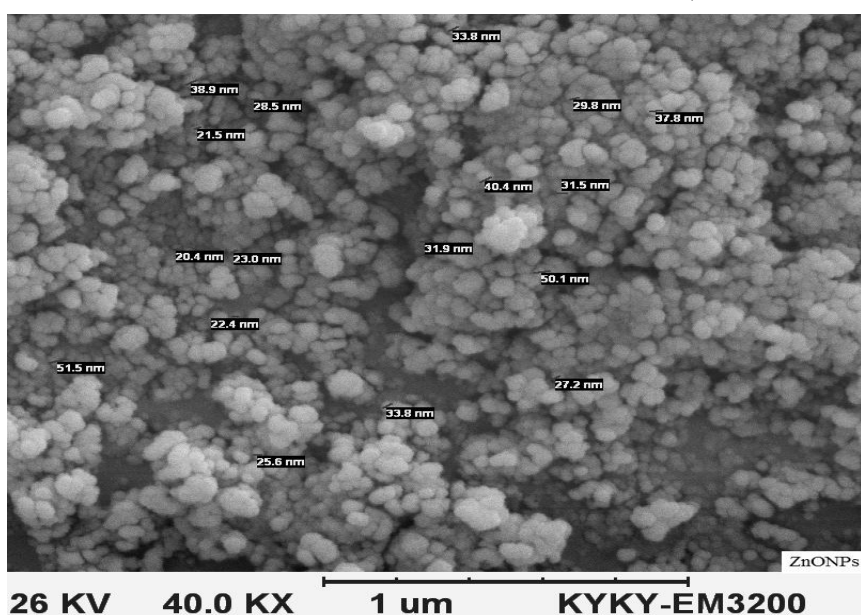
سوپرناتانت عاری از میسیلیوم قارچی *Aspergillus niger* strain ZRS14، دارای تحمل پذیری بالا نسبت به یون روی، قادر به سنتز نانوذرات اکسید روی، در غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر از یون سمی روی بود که با ایجاد تغییر رنگ محلول واکنش زیست تبدیلی از سفید به شیری شناسایی شد. در محلول کنترل (استات روی عاری از سوپرناتانت) هیچ تغییر رنگی در محلول واکنش مشاهده نشد (شکل ۵). نمایان شدن رنگ شیری پس از واکنش زیست تبدیلی با استات روی بیانگر کاهش یون روی و تشکیل نانوذرات اکسید روی است. نانوذرات اکسید روی به علت تحریک ارتعاشات پلاسمون سطح بسته به اندازه ذرات تشکیل شده و همچنین ریخت شناسی آنها، به رنگ سفید متمایل به شیری تا زرد هستند و همین ابزاری ساده و مناسب برای تایید اولیه نانوذرات اکسید روی در محلول واکنش زیست تبدیلی می باشند (۲۴ و ۲۵).

که با نمونه استاندارد نانوکریستال‌های اکسید روی کاملاً همخوانی دارد (۱۱ و ۲۶).



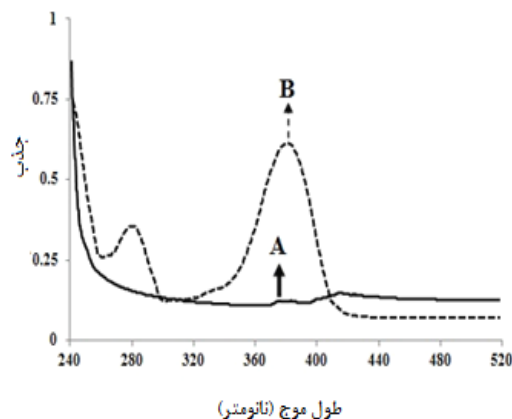
شکل ۷- الگوی XRD نانوذره اکسید روی که در محلول واکنش زیست تبدیلی توسط سوپرناتانت قارچی *A. niger* isolate ZRS14 ساخته شده است.

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM نیز سنتز نانوذرات اکسید روی با توزیع کمابیش باریک اندازه ذرات و متوسط اندازه ذرات ۳۲ نانومتر و اشکال کروی را نشان داد (شکل ۸).



شکل ۸- میکروگراف های SEM حاصل از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط سویه قارچی *Aspergillus niger* strain ZRS14

موج‌های بین ۲۴۰ تا ۵۲۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۶).



در ادامه این پژوهش، تحلیل XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی اکسید روی انجام شد. براساس نتایج بدست آمده که در شکل (۷) نشان داده شده است، نانوذرات کریستالی اکسید روی در سطوح ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱، ۱۱۰، ۱۰۳ و ۱۱۲ پیک‌های را نشان داد

در ادامه این پژوهش، تحلیل XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی اکسید روی انجام شد. براساس نتایج بدست آمده که در شکل (۷) نشان داده شده است، نانوذرات کریستالی اکسید روی در سطوح ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱، ۱۱۰، ۱۰۳ و ۱۱۲ پیک‌های را نشان داد

بحث و نتیجه گیری

میکروارگانسیم‌های مختلف شامل: باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و اکتینومیسیت‌ها برای سوخت و ساز و انجام فرآیندهای حیاتی خود از منابع آلی و معدنی موجود در محیط تغذیه می‌کنند. این ارگانسیم‌ها طی فرآیندهای متفاوت، هنگامی که در معرض یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، آن‌ها را در درون یا بر روی دیواره سلولی خود انباشته می‌کنند. این انباشتگی بیشتر به تولید ذراتی منجر می‌شود که در اندازه‌های نانوذرات بسته‌بندی می‌شوند (۳). توسعه روش‌های مختلف تولید نانوذرات از نظر دستیابی به ذراتی با ترکیب و اندازه دانه معین و توزیع مناسب، مصرف انرژی پایین و سهولت کار در حال بررسی و مطالعه است. با توجه به نیاز روز افزون بشر برای ساخت ابزار و وسایل با آلودگی زیست محیطی کمتر، محققان به استفاده از سامانه‌های زیستی روی آورده‌اند. محققان برای ساخت نانوذرات موفق به جداسازی موجودات زنده تک سلولی و پرسلولی شده‌اند که قادرند بصورت داخل یا خارج سلولی این نانوذرات را تولید نمایند. عده‌ای از جانداران موجود در طبیعت قادر به تولید مواد آلی در داخل و خارج سلول هستند. مثلاً باکتری‌های مگنتو تاکتیک می‌توانند نانوذرات مغناطیسی تولید کنند، دیاتومه‌ها مواد سیلیسی تولید نموده و موجودات زنده چند سلولی برای ساخت ترکیبات آلی یا معدنی مرکب و پیچیده بکار گرفته شده‌اند. این ترکیبات معدنی زیستی شامل: مواد معدنی معمولی و برخی از ترکیبات آلی مخصوص مانند پروتئین، چربی و پلی ساکاریدها هستند (۳ و ۴). تهیه نانوذرات اکسید روی به دلیل خواص نوری، الکتریکی، شیمیایی و فتوشیمیایی منحصر بفردی که دارد، جالب توجه است. نانو کریستال‌های فلزی اکسید روی در

کاتالیز و ساخت سنسورها و زیست واکنشگرها، ساخت نیمه‌هادی‌ها^{۲۹} و فیلتر کننده UV^{۳۰} استفاده شده و همچنین دارای کاربردهای گسترده‌ای در صنایع علوم زیستی، بهداشتی و آرایشی، شیمیایی، نوری و الکتریکی و صنایع نساجی و پزشکی هستند (۲۷). با توجه به مشکلات زیادی که در روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات وجود دارد، استفاده از میکروارگانسیم‌های مختلف به‌عنوان نانوکارخانه‌های بالقوه سبز برای سنتز نانوذرات همسو و سازگار با محیط زیست، پایدار و همچنین مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی پیشنهاد شده است (۲۸). در میان میکروارگانسیم‌های مختلف استفاده از قارچ‌های رشته‌ای از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. قارچ‌ها به دلیل توانایی شان در سنتز آنزیم‌ها و پروتئین‌های ترشحی فراوان و همچنین سنتز نانوذرات خارج سلولی پربازده که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه هستند، کاندیدای مناسبی برای تولید زیستی نانوذرات فلزی هستند. در تحقیقاتی که در ارتباط با پتانسیل سویه‌های قارچی در تولید انواع نانوذرات فلزی انجام شده، قارچ‌هایی از جنس *Verticillium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichothecium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Phanerochate* sp., *Aspergillus* sp. و *Colletotrichum* sp. عمدتاً نانوذرات نقره و طلا و در مواردی مگنتیت، کادمیوم، پلاتینیوم و زیرکونیوم استفاده شده است (۳ و ۴). در این پژوهش، پتانسیل سویه‌های بومی قارچی در سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی ارزیابی شده است. در این راستا، در مرحله نخست ۱۵ سویه قارچی از خاک‌های جمع‌آوری شده از معادن سرب و روی انگوران واقع در استان زنجان غربال‌گری و تحمل‌پذیری

مختلفی از نانوذرات فلزی، مطالعات وسیعی در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. اما با این حال در ارتباط با سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی مطالعه محدودی انجام شده که در زیر به آن‌ها اشاره شده است. در مطالعه انجام شده توسط پراساد و ژا در سال ۲۰۰۹، از کشت باکتری *Lactobacillus sporogens* برای سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی از یک محلول کلریدی به منظور دستیابی به نانوذرات ۵ تا ۱۵ نانومتری، در دما و فشار محیط استفاده شده است (۱۱). رالی^{۳۱} و تافدر^{۳۲}، از سوپرناتانت عاری از میسیلوم قارچ *Aspergillus fumigatus*، برای سنتز نانوذرات اکسید روی از محلول نیترات روی استفاده کردند (۳۰). در جدیدترین تحقیقات انجام شده در ارتباط با تولید خارج سلولی نانو ذرات اکسید روی با استفاده از سویه‌های قارچی، نتایج تحقیقات جاین و همکارانش^{۳۳} (۱۸) نشان داد که سوپرناتانت کشت قارچی *Aspergillus aeneus*، بعد از مواجهه با محلول استات روی، قادر به سنتز نانوذرات اکسید روی پس از ۷۲ ساعت گرما گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است. مطالعه اخیر برای اولین بار در سطح کشور انجام شده و نتایج این پژوهش می‌تواند در سطح مجامع داخلی و بین‌المللی در راستای معرفی سویه‌های میکروبی جدید و همچنین معرفی سویه‌های مذکور به مراکز علمی پژوهشی، مراکز دانشگاهی و نانوزیست فناوری در راستای تحقیقات بیشتر با هدف بهره برداری تجاری از زیست واکنشگرهای غربال‌گری شده، استفاده شود. اگرچه براساس نتایج تحقیقات گاد^{۳۴} و همکارانش (۳۱) و سونی^{۳۵} و پراکش^{۳۶} (۳۲) به ترتیب تولید نانوذرات نقره و طلا در سویه‌های از *Aspergillus niger* گزارش شده است اما با این وجود، در این پژوهش، سویه ای از

ذاتی این جدایه‌ها نسبت به یون سمی روی در محیط‌های کشت کمپلکس و سنتتیک ارزیابی شد (شکل ۱). براساس یافته‌های حاصل از تعیین پروفایل تحمل پذیری به روش رقت در آگار، سویه ZRS14 دارای بیشترین تحمل پذیری در محیط‌های کشت کمپلکس و سنتتیک بود. سویه یاد شده به‌عنوان سویه برتر انتخاب، شناسایی ریخت‌شناسی و مولکول شد. نتایج تحلیل‌های ریخت‌شناسی و فیلوژنیک نشان داد که سویه مذکور دارای بیش‌ترین مشابهت با *Aspergillus niger* است. توالی نوکلئوتیدی ژن 5.8S rDNA-ITS2 سویه ZRS14 با شماره دسترسی KF414527 در بانک اطلاعات ژنی NCBI قابل دسترس است. در ادامه، این تحقیق با هدف سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی توسط *Aspergillus niger strain ZRS14* از سوپرناتانت عاری از میسیلوم قارچی به‌عنوان بیوکاتالیزور برای تهیه نانوذرات اکسید روی از محلول استات روی در یک واکنش زیست تبدیلی استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده، سوپرناتانت سویه قارچی مذکور بعد از مواجهه با محلول استاتی روی، قادر به سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی پس از ۷۲ ساعت گرما گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است. مزیت سنتز خارج سلولی نانوذره اکسید روی توسط قارچ *Aspergillus niger ZRS14* جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید داخل سلولی نانو ذره مذکور پر هزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی برای استخراج نانو ذرات از درون سلول دارد (۲۹). بنابراین، به‌وسیله قارچ مذکور می‌توان به تولید خارج سلولی نانوذرات اکسید روی، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج، دست یافت. اگرچه در ارتباط با تولید انواع

- microbes. *Adv Colloid Interface Sci*; 2010; 156 (1-2): 1-13.
- (4) Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*; 2009; 6 (2): 257-62.
- (5) Luechinger NA, Grass RN, Athanassiou EK, Stark WJ. Bottom-up fabrication of metal/metal nanocomposites from nanoparticles of immiscible metals. *Chem Mater*; 2010; 22 (1): 155-60.
- (6) Li X, Xu H, Chen Z, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nano Mat*; 2011; 2011: 1-16.
- (7) Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2006; 69 (5): 485-92.
- (8) Ge MY, Wu HP, Niu L, Liu JF, Chen SY, Shen PY, et al. Nanostructured ZnO: from monodisperse nanoparticles to nanorods. *J Cryst Growth*; 2007; 305 (2): 162-6.
- (9) Shokuhfar T, Vaezi MR, Sadrnezhad SK, Shokuhfar A. Synthesis of zinc oxide nanopowder and nanolayer via chemical processing. *Int J Nanomanuf*; 2008; 2 (1-2): 149-62.
- (10) Moghaddam AB, Nazari T, Badraghi J, Kazemzad M. Synthesis of ZnO nanoparticles and electro deposition of polypyrrole/ZnO nanocomposite film. *Int J Electrochem Sci*; 2009; 4 (2): 247-57.
- (11) Prasad K, Jha AK. ZnO Nanoparticles: Synthesis and Adsorption Study. *Natural Science*; 2009; 1 (2): 129-35.
- (12) Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Coll Surf B*; 2003; 28 (4): 313-18.

Aspergillus niger ZRS14، با پتانسیل سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی گزارش شد. از دیگر دستاوردهای این پژوهش می توان به جداسازی یک سویه قارچی با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به فلز روی و شاید سایر فلزات سنگین اشاره کرد و شاید بتوان از آن در تولید زیستی سایر نانوذرات اکسید فلزی با ارزش بهره گرفت. امید است با بهینه سازی شاخص های فیزیکی - شیمیایی و شرایط محیطی واکنش زیستی، در آینده از *Aspergillus niger* isolate ZRS14، به عنوان یک زیست واکنشگر کارآمد و دوستدار محیط زیست برای تهیه زیستی نانوذرات فلزی اکسید روی در مقیاس های بزرگتر از مقیاس آزمایشگاهی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۲۳۸۰/۱۳۹۱ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می شود.

References

- (1) Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Review of some interesting Surface Plasmon Resonance- enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*; 2007; 2 (3): 107-18.
- (2) Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Delivery Rev*; 2008; 60 (11): 1289-306.
- (3) Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by

- (13) Chen JC, Lin ZH, Ma XX. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp.3.2883 with silver nitrate. *Lett Appl Microbiol*; 2003; 37 (2):105-8.
- (14) Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotech*; 2004; 2 (3):1-6.
- (15) Wang ZL. Energy harvesting for self-powered nanosystems. *Nano Res*; 2008; 1 (1): 1-8.
- (16) Park S, Lee JH, Kim HS, Park HJ, Lee JC. Effects of ZnO nanopowder dispersion on photocatalytic reactions for the removal of Ag⁺ ions from aqueous solution. *J Electroceram*; 2009; 22 (1-3): 105–9.
- (17) Lee CY, Haung YT, Su WF, Lin C-F. Electroluminescence from ZnO nanoparticles/organic nanocomposites. *Appl Phys Lett*; 2006; 89 (1-2): 231116-8.
- (18) Jain N, Bhargava A, Tarafdar JC, Singh SK, Panwar J. A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2013; 97 (2): 859-69.
- (19) Lourdes AM, Accensi F, Cano J, Cabanes FJ. Taxonomy and significance of black *Aspergilla*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 2004; 86 (1): 33–49.
- (20) Washington JA, Sutter VL. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler JR, WJTruant, J. (Eds.) , Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed., Washington DC; American Society for Microbiology; 1980.
- (21) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor (NY) ; Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- (22) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JT. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. New York:Academic Press; 1990.
- (23) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*; 2007; 24 (8):1596–9.
- (24) Chang H, Tsai MH. Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles having prism shape by a novel gas condensation process. *Rev Adv Mater Sci*; 2008; 18 (8): 734-43.
- (25) Waghmare SS, Deshmukh AM, Kulkarni SW, Oswaldo LA. Biosynthesis and characterization of manganese and zinc nanoparticles. *J Environ Res Technol*; 2011; 1 (1): 64-9.
- (26) Yang L, Wang G, Tang C, Wang H, Zhang L. Synthesis and photoluminescence of corn-like ZnO nanostructures under solvothermal-assisted heat treatment. *Chem Phys Letts*; 2005; 409 (1-3): 337–41.
- (27) Vaseem M, Ahmad U, Yoon-Bong H. ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. [Dissertation]. American Scientific Publishers, USA: Chonbuk National Univ.; 2010.
- (28) Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Nano Lett*; 2012; 2 (32): 1-10.
- (29) Ahmad A, Senapati S, Islam Khan M, Kumar R, Ramani R, Srinivas V, et al. Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* sp. *Nanotechnology*; 2003; 14 (7): 824-28.
- (30) Raliya R Tarafdar JC. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agric Res*; 2013; 2 (1): 48–57.
- (31) Gade AK, Bonde P, Ingle AP, Marcato PD, Duran N, Rai MK. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *J Biobased Mater Bioenergy*; 2008; 3 (2): 123-29.
- (32) Soni N, Prakash S. Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. *J Report Parasitol*; 2012; 2 (1): 1-7.

1. Biocatalysts
2. Biomass
3. Downstream process
4. Monodispersity
5. Prasad
6. Jha
7. Jain
8. $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$
9. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
10. Potato Dextrose Agar=PDA
11. Potato Dextrose Broth=PDB
12. E. Merck, Darmstadt, Germany
13. HiMedia, Mumbai, India
14. Cinnagen company, Iran
15. Spread plate method
16. Optical density= $\text{OD}_{530\text{nm}}$
17. Inoculum
18. Initial denaturation
19. Annealing
20. Final elongation
21. Fermentase
22. Macrogen
23. NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)
24. MEGA. 4 (<http://www.megasoftware.net/>)
25. Analytik Jena's spectrophotometer SPECORD 210, Carel Zeiss Technology, Germany
26. X-ray Diffractometer, D8ADVANCE, Bruker, Germany
27. KYKY-EM3200, KYKY Technology Development Ltd., China
28. Surface Plasmon Resonance
29. *Quantum dots*=Semiconductor
30. UV filtering
31. Raliya
32. Tarafdar
33. Jain *et al*
34. Gade
35. Soni
36. Prakash

Isolation and characterization of a native strain of *Aspergillus niger* ZRS14 with capability of high resistance to zinc and its supernatant application towards extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticles

Morahem Ashengroph *

Assistant Professor of Microbiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract

Introduction: Zinc oxide nanoparticles have quite a few applications in the fields of biology, optics, mechanics, magnetism, energy, hygiene and medicine. Due to serious problems associated with physiochemical synthesis of ZnO nanoparticles, including environmental pollution, complicated and costly processes, there is a growing need to develop a simple biological procedure for synthesis of nanoparticles to achieve the monodisperse-sized particles with a higher purity, low energy consumption and a cleaner environment. We conducted this investigation to screen and isolate native fungi strains capable of high zinc metal tolerance ability and a potential for extracellular synthesis of ZnO nanoparticles using fungal secretions as biological catalysts.

Materials and methods: 15 different strains of fungi were isolated from soil samples collected from lead and zinc mines of Angoran-Zanjan using conventional enrichment process and characterized initially based on macroscopic and microscopic characteristics and colony morphology. The intrinsic tolerance of the isolated strains to zinc toxic metal was measured in the synthetic and complex media using the agar dilution method. The supernatants of isolated fungi were incubated with zinc acetate solution in a shaker incubator for 72h; then, the strain that was able to synthesis ZnO nanoparticle was identified. The ZnO nanoparticles formation was investigated by using spectroscopic techniques and microscopic observations.

Results: Among the 15 isolated strains, the strain ZRS14 had highest zinc metal tolerance ability and was selected and identified as *Aspergillus niger* strain ZRS14 (GenBank accession number KF414527) based on morphological and molecular phylogenetic analysis. For synthesis of ZnO nanoparticles by isolated *A. niger* ZRS14, fungal cell-free filtrate of the strain was collected and incubated in the presence of zinc acetate solution at a final concentration of 250 mg/l zinc metal ion at 28° C for 72 h on a rotary shaker (150 rpm) under dark conditions. Results obtained by visual observations, spectral data achieved from UV-vis, XRD spectrum and SEM micrographs revealed the extracellular formation of ZnO nanoparticles with narrow size distribution and average particle size of 32 nm with the collected cell-free filtrate of *A. niger* isolate ZRS14.

Discussion and conclusion: Owing to the extracellular synthesis of ZnO nanoparticles, the obtained results in the current study suggest that the *A. niger* strain ZRS14 has a considerable potentiality that can be efficiently used as an eco-friendly biocatalyst for the preparative synthesis of ZnO nanoparticles. The present investigation is the first report on the biological synthesis of ZnO nanoparticles using newly isolated strain of *Aspergillus niger* ZRS14.

Key words: *Aspergillus niger* ZRS14, Biological synthesis, Tolerance pattern, ZNO nanoparticles

* Corresponding Author

Received: August 19, 2013 / **Accepted:** October 7, 2013